

A

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭60—24450

⑬ Int. Cl.⁴
G 01 N 33/53
A 61 K 39/44
C 12 Q 1/00
G 01 N 33/532

識別記号

庁内整理番号
7906—2G
7043—4C
8213—4B
7906—2G

⑭ 公開 昭和60年(1985)2月7日

発明の数 1
審査請求 未請求

(全 7 頁)

⑮ 生物学的に活性な物質の測定法

⑯ 発明者 保坂俊太郎

鎌倉市手広1111番地東レ株式会社
社基礎研究所内

⑰ 特 願 昭58—130893

⑱ 出 願 昭58(1983)7月20日

⑲ 出 願 人 東レ株式会社

⑳ 発 明 者 内田隆史

鎌倉市手広1111番地東レ株式会
社基礎研究所内

東京都中央区日本橋室町2丁目
2番地

明 細 書

1. 発明の名称

生物学的に活性な物質の測定法

2. 特許請求の範囲

(1) 検体溶液中の生物学的に活性な物質を免疫学的反応を利用して測定する方法において、被測定物質と特異的に結合する物質または被測定物質と同一の物質にビオチンを結合させたビオチン結合物質の存在下に該免疫学的反応を進行させ、該免疫学的反応によって生成した免疫複合体に、化学発光剤または生物発光剤を結合させた発光剤結合アビジンを反応させ、ビオチン—アビジン結合により免疫複合体に結合した発光剤結合アビジンまたは免疫複合体に結合せず遊離の状態に残った発光剤結合アビジンの発光反応による発光量を測定することを特徴とする生物学的に活性な物質の測定法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は生物学的に活性な物質の測定法に関

するものであり、さらに詳しくは、ビオチンとアビジンとの反応を応用した発光免疫測定法に関するものである。

近年、抗原抗体反応を利用し、微量成分を定量的に測定する方法が臨床検査および医学、獣医学、薬学、微生物学などの研究分野において利用されてきている。

赤血球凝集反応や免疫拡散法などの古典的方法に加えて、最近では抗原・抗体反応により生じさせた免疫複合体を光散乱により測定するネフエロメトリー、ルミネッセントや放射性同位元素または酵素などで抗体もしくは抗原を標識し、抗原もしくは抗体を測定する標識免疫測定法、さらに加えて合成ポリマー微粒子に抗原や抗体を固定化し、抗体や抗原の存在でおこる微粒子の凝集の程度をガラス板上やマイクロプレートで観察することや、凝集にともなう光の透過度の変化を分光光度計で測定することで抗体や抗原の測定をおこなう方法も開発されつつある。

とりわけ、放射性同位元素を用いた免疫測定法(RIA)は、最も高感度の分析法として広く実用的に利用されているが、放射性同位元素を取り扱うため、被爆の危険が伴うし、特別の施設も必要となる。したがってRIAにかわる高感度測定法の実現が求められている。

なかでも、ルミネッセンス^入免疫測定法(LIA)はRIAの利点を残し、放射性同位元素のかわりにルミネッセントを利用する取り扱いやすい方法である。しかし、現在のところLIAはRIAに比較して、感度が低いので、適用範囲が限られている。また、一部の物質については、RIAに匹敵する測定感度をあげている測定法として酵素免疫測定法(EIA)があるが、必ずしも全ての物質についてRIAと同様の感度をあげているわけでもなく、試薬も比較的高価であり、また取り扱いもRIAやLIAほど容易ではないので、RIAを凌駕するまでに至っていない。

一般にRIA法に代表される免疫測定法は原

理的に2方法に大別される。1つは競争法であり他の1つはサンドウィッチ法と称されている方法である。競争法とは、抗原もしくは抗体である被測定物質を含む測定試料液と、前もって放射性同位元素などの標識剤で標識しておいた既知濃度の被測定物質を混合し、そこに抗体もしくは抗原を混合し反応させると抗原-抗体複合物ができるが、複合物または複合物を形成しなかった遊離物質には標識された被測定物質と標識されていない被測定物質が含まれており、その比率を測定することで検体中の被測定物質の測定をおこなう方法である。他の1つの方法であるサンドウィッチ法は、被測定物質と特異的に結合する結合のパートナーを固定化しておいた固相と、別に用意した被測定物質と特異的に反応しうる物質を放射性同位元素などで標識して得た標識した結合物質とで被測定物質をサンドウィッチした後、固相もしくは液相中の標識物質の測定をおこなうことにより、被測定物質の測定をおこなう方法である。

本発明者らはRIAにかわる安全で安価でしかも操作が容易な高感度測定法を開発すべく検討した結果、本発明に到達した。すなわち本発明は検体溶液中の生物学的に活性な物質を免疫学的反応を利用して測定する方法において、被測定物質と特異的に結合する物質または被測定物質と同一の物質に、ビオチンを結合させたビオチン結合物質の存在下に該免疫学的反応を進行させ、該免疫学的反応によって生成した免疫複合体に、化学発光剤または生物発光剤を結合させた発光剤結合アビジンを反応させ、ビオチン-アビジン結合により免疫複合体に結合した発光剤結合アビジンまたは免疫複合体に結合せず遊離の状態に残った発光剤結合アビジンの発光反応による発光量を測定することの特徴とする生物学的に活性な物質の測定法に関する。

本発明の発光免疫測定は、微量成分の測定を可能にするものである。

本発明の発光免疫測定法ではアビジンに多数の発光剤を結合させることが可能であることが

従来のLIAのような被測定物質や被測定物質と特異的に反応する物質を直接発光剤で標識する方法に比較して格段の感度を得ることができる。しかも、従来の方法においては感度をあげる為に標識する発光剤を無理に増やさざるを得ず、そのために、バックグラウンドが高くなり、かつ誤差も大きくなってしまふ欠点を有していたが、本方法では容易に高感度をあげることができ、S/N比も小さくでき、誤差も少くできる。

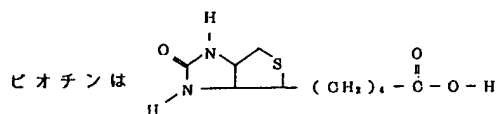
本発明の発光免疫測定法には代表的な方法としてサンドウィッチ法および競争法がある。

サンドウィッチ法は、検体溶液中の生物学的に活性な被測定物質と、被測定物質に特異的に結合する結合のパートナーを固定化した固相、および被測定物質に特異的に結合する性質がありかつビオチンを結合させたビオチン結合物質を反応させた後、化学または生物発光剤を結合させた発光剤アビジンを反応させ、ビオチン-アビジン結合により固相に結合した、または結合

しないで遊離の状態に残った発光剤結合アビジンの発光反応による発光量を測定することにより被測定物質を測定する方法である。

競争法は、検体溶液中の生物学的に活性な被測定物質およびビオチンを結合させたビオチン結合、被測定物質を、被測定物質に特異的に結合する結合のパートナーを固定化した固相に反応させた後、化学または生物発光剤を結合させた発光剤結合アビジンを反応させ、ビオチン-アビジン結合により固相に結合した、または結合しないで遊離の状態に残った発光剤結合アビジンの発光反応による発光量を測定することにより、被測定物質を測定する方法である。

本発明で使用するアビジンは卵白中に存在する分子量約68000の塩基性糖蛋白質であり、



の構造を持つ物質である。

リレート)、ポリ(2-オキシエチルメタクリレート)、ポリ(2,3-ジオキシプロピルアクリレート)、ポリ(2,3-ジオキシプロピルメタクリレート)、ポリエチレングリコールメタクリレートなどの架橋した親水性重合体群、もしくは両方の性質を持つ共重合体群がある。

検体中の物質、ビオチン結合物質または発光剤結合アビジンなどの非特異的吸着を少なくし、S/N比を高くする為には親水性重合体群もしくは共重合体群が好ましい。また固相の形状は板、試験管、マイクロプレートなどでもよいが、微粒子を固相とすれば表面積を容易に増加させることができる。

固相への結合のパートナーの固定化方法としては、物理吸着と化学結合がある。例えば疎水性な固相には蛋白などは物理吸着で固定化できるし、アミノ基やカルボキシル基が官能基として存在する固相にはカルボジイミドでカルボキシル基やアミノ基を有する物質を共有結合で固定化できるし、アミノ基またはカルバモイル基

アビジンとビオチン極めて強い親和性を有しており、その親和定数は 10^{11} M^{-1} である。本発明はこのアビジン-ビオチン結合を利用して、発光免疫測定をおこなうことを特徴とするものである。

本発明で固相と検体の反応をおこなう場合に使用する固相は特に限定はない。形状は球状、微粒子状、棒状、板状、膜状など適当な形状のものでよい。粒子状の固相を使用すれば、固相をカラムにつめて測定の操作をフロー形式でおこなうことも可能となる。固相の素材は生体構成成分や金属などでもよいが、形状を自由に調節でき、しかも安定である有機高分子化合物が好ましい。例えばポリスチレン、ポリアクリロニトリル、ポリメタクリロニトリル、ポリメタクリル酸メチル、ポリ-ε-カプラミド、ポリエチレンテレフタレートなどの疎水性重合体群、あるいはポリアクリルアミド、ポリメタクリルアミド、ポリ-N-ビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリ(2-オキシエチルアク

を有する固相にはアミノ基を有する物質をグルタルアルデヒドなどのポリアルデヒドで共有結合により固定化できるし、ヒドロキシル基を有する固相には臭化シアンによりアミノ基を有する物質を共有結合で固定化できる。また、アルデヒド基またはエポキシ基を有する固相にはアミノ基を有する物質を直接反応させて共有結合により固定化できる。

またメルカプト基を有する固相には、メルカプト基を有する物質をジマレイミドをバインダーとして結合させることができる。固相の洗浄に界面活性剤を含有させた洗浄液を使用することもあり、固定化方法としては固定化した物質が脱離する危険のある物理吸着法に比して共有結合法が好ましい。

本発明で使用する結合のパートナーとは被測定物質に特異的に結合しうる物質である。例えば、被測定物質が抗原、抗体、ホルモン、抗原抗体複合体、糖類、免疫グロブリン、リンフォカイン、補体などの場合には順に抗体、抗原、

該ホルモンリセプター、リユーマチ因子、レクチン、プロテインA、該リンフォカインリセプター、該補体リセプターなどとの組み合わせがそれぞれ被測定物質と結合のパートナーの組み合わせになりうる。また全ての物質について、特異抗体が存在する場合には、その特異抗体および対応する抗原パートナーとなりうる。

サンドウィッチ法では、一般にはまず結合のパートナーを固定化した固相と検体とを反応させ次に、被測定物質が結合のパートナーを介して結合した固相とビオチン結合物質とを反応させる。この後にサンドウィッチ法では一般的に固相と被相とを分離し洗浄する操作がある。しかし、固相側とビオチン結合物質側とに同一物質に対するしかも別の抗原結合部位に対する抗体を結合させるなどして、1段階の反応で固相とビオチン結合物質によって被測定物質をサンドウィッチすることによりこの段階での分離および洗浄操作をはぶくことも可能である。

一方、競争法でも検体とビオチン結合物質と

を同時に加えないで、検体と固相との反応後にビオチン結合物質を加えることがあるが、どちらにしてもビオチン結合物質を固相の結合のパートナーと反応させている。

本発明のサンドウィッチ法で使用するビオチン結合物質は被測定物質と特異的に結合する物質であればよく、固相に固定化した結合のパートナーと同一物質であってもかまわないし、異なる物質であってもかまわない。

例えば被測定物質がイムノグロブリンの場合、固相に結合させる結合のパートナーとしてプロテインAを用い、ビオチン結合物質として抗イムノグロブリン抗体を用いてもよいし、また両者共に抗イムノグロブリン抗体を用いてもよい。

被測定物質と特異的に結合する物質または被測定物質と同一の物質へのビオチンの結合は、アビジンとビオチンとの親和性が極めて強いことから、共有結合が最も好ましい。具体的には、ビオチンのカルボキシル基をスクシイミジル化するか、もしくはそのままカルボジイミドを

用いて結合させる方法等が好ましく使用される。

本発明において被測定物質となりうる物質は、生物学的に特異的な親和性を有する物質をパートナーとして有している物質であり、具体的には例えば連鎖球菌、ブドウ球菌、ジフテリア菌、サルモネラ菌、赤痢菌などの細菌およびその構成成分に対する抗体；梅毒トレポネーマなどのスピロヘータおよびその構成成分に対する抗体；マイコプラズマおよびその構成成分に対する抗体；マラリア原虫などの原虫類およびその構成成分に対する抗体；リケッチャおよびその構成成分に対する抗体；インフルエンザ、アデノウイルス、ポリオーマ、麻疹、風疹、肝炎、おたふくかぜなどのウイルスおよびその構成成分ならびにそれらに対する抗体；多糖類、ヒトアルブミン、卵白アルブミンなどの異種抗原ならびにそれらに対する抗体；インシュリン、サイロイドホルモン、絨毛性ゴナドトロピンなどのホルモン；リボヌクレアーゼ、クレアチンホスホキナーゼ、アスパラギナーゼなどの酵素；腎

臓細胞膜、肝臓細胞膜、 α -フェトプロテイン、CEAなどの器管固有の抗原またはリセプター；コラーゲン、アミロイドなどの結合組織成分；赤血球、血小板などの血球抗原、またはリセプター；フィブリン、プラズミノゲンなどの血漿タンパク質；リユーマチ因子やC反応性タンパク質などの病理グロブリン；免疫複合体；細胞膜などに対する自己抗体；などがある。

ビオチン結合物質と検体が結合した固相を反応させた後、発光剤結合アビジンを加えて反応させる。ビオチン結合物質と発光剤結合アビジンは検体溶液に同時に加えてもよいが、後で発光剤結合アビジンを加えた方が、誤差が少なくなり好ましい。

アビジンに結合させる発光剤は化学発光剤でも生物発光剤でもかまわない。生物発光剤にはルシフェリンなどがあるが、酵素などの生体物質を使用するので反応も煩雑かつ複雑となり、特に生体物質を免疫反応により測定する時には測定誤差を与える可能性もある。したがって発

光剤としては化学発光剤の方が好ましい。化学発光剤としては、ルミノール、イソルミノール、ロフィン、ルシゲニンなどがあるが、発光の量子効率、安定性、操作性などの点を考慮すると、ルミノール、イソルミノールおよびその誘導体が好ましい。

発光剤のアビジンへの結合はアビジンのビオチンへの結合力を弱めない方法であればどのような結合方法でもよいが、操作中に発光剤がアビジンから遊離し、検査値が変動したりしないためには共有結合が最も好ましい。具体的には、アビジンが塩基性蛋白でありアミノ基を多数有していることからこのアミノ基を利用して、あるいは発光剤の官能基（たとえばルミノール、イソルミノールまたはそれらの誘導体の場合はアミノ基）を利用して、グルタルアルデヒド、ジスクシミジル酒石酸、ジスクシミジルスベレート、エチレングリコールビス（スクシミジルスクシネート）、N-ヒドロキシスクシミジル-(4-アジドフェニル)-1, 3'-ジチオ

ピロピオネート、両末端にアルデヒド基、スクシミジル基、アジド基等を有する結合剤を用いる方法等が好ましく使用される。

ビオチン結合物質が結合した固相と発光剤結合アビジンとの反応後、液相と固相とを分離し、どちらかの発光を測定する。アビジンに結合した発光剤を発光させる方法は、遊離の発光剤の場合と同様である。発光剤が生物発光剤の場合には酵素、例えばルシフェリンルシフェラーゼや補酵素、例えばATPを添加し測定する。化学発光剤の場合には触媒の存在下に酸化剤を加えて反応させる。

酸化剤としては例えば過酸化水素、次亜塩素酸ナトリウム、過硫酸アンモニウム、過ホウ酸ナトリウム、ヨウ素、過ヨウ素酸ナトリウム、分子状酸素、過酸化カリウム、過マンガン酸カリウムなどを挙げることができる。触媒は一般に金属化合物で、例えば赤血塩、ヘモグロビン、ヘマチン、ヘミン、フェリチン、ポルフィリン、塩化第一コバルト、酢酸銅、チトクロームCな

どをはじめ、ニッケル、マンガン、クロムなどの塩類、錯塩類および有機金属化合物を使用することができる。

発光量の測定には、フォトンカウンター、シンチレーションカウンターなど発生した光子数を計測できる装置を使用することが好ましい。

既知濃度の被測定物質を本方法で測定し、被測定物質濃度と発光強度との関係を求めておき、未知濃度の被測定物質の発光強度から逆に被測定物質の定量をおこなう。本方法は発光剤結合アビジンの発光強度を増大させることで測定感度を高くすることが可能な方法である。

以下に本発明の理解を容易にする為若干の実施例を示した。

実施例1

(ウサギイムノグロブリンG(RGG)の測定)

固相の調製

グリシジルメタクリレート4.42g、2-ヒドロキシエチルメタクリレート0.46g、トリエチレングリコールジメタクリレート0.5gを

プロピオン酸エチル5g、四塩化炭素5gの混合溶媒に溶かして2, 2'-アゾビス(2, 4-ジメチルバレロニトリル)10mgを加え40℃で3時間重合した。得られた微粒子をアンモニアで処理しアミノ基を導入した後H₂SO₄で残存エポキシ基を加水分解し直径約6μの親水性アミノ化微粒子を得た。

抗RGG抗体固定化固相

デキストランT70(Pharmacia)10mgと過ヨウ素酸ナトリウム5mgを1mlの水に溶解し、40℃で1.5時間反応させ、デキストランの一部をアルデヒド化した。10mg/mlのアルデヒド化デキストラン容器10mlと1%のアミノ化微粒子分散液5mlとを混合し、pH8.0にて30℃で1時間反応させた。このようにして得たデキストラン化微粒子を200μg/mlになるように溶解した抗RGG(Biorad)抗体溶液に分散し、pH8.0にて30℃で30分反応させ、さらにウシ血清アルブミン(以下BSAと略す)(Miles)を10mg/mlとなるように

加え、4℃で一晩反応させた。さらに0.1 M TRIS-HCl緩衝液(pH 8.0)を等量加え、室温で1時間反応させた後、シアン水素化ホウ素ナトリウムを2 mg/mlとなるように加え、室温で1時間反応させた。PBSで微粒子を洗浄し、1%のBSAを含む生理リン酸食塩水(以下PBSと略す)に保存した。

ルミノール結合アビジンの調製

ルミノール(半井化学)1.0 ngとアビジン(Vector Laboratories)2 mgを0.01 M NaHCO₃-HCl緩衝液(pH 8.0)1 ml中で溶解し、ジスクシミジル酒石酸(Pierce)を加えて4℃で3日間反応させた。反応後0.1 M TRIS-HCl緩衝液(pH 8.0)を500 μl加え4℃で2日反応させた。

ルミノール結合アビジンはSephadex G-25(Pharmacia)によるゲル濾過をおこない精製した。

RGGの測定

RGGを1%BSAを含むPBSで10倍ず

つ希釈して検体溶液とした。検体90 μlに1%の抗RGG固定化固相分散液50 μlを加え、室温で2時間反応させた。

固相を~~3000~~³⁰⁰⁰ rpm 5分の遠心操作により沈澱させ、再分散させる操作により、洗浄した後、0.15 mg/mlのビオチン結合抗RGG抗体(Vector Laboratories)100 μlに固相を分散させ室温で2時間反応させた。洗浄後、22 ng/mlのルミノール結合アビジン100 μlを加え、室温で1時間反応させた。

反応後、固相と液相を遠心操作により分離し、固相を100倍に希釈した固相分散液100 μlに0.0016%の塩化第一コバルト溶液100 μlおよび25%の原液を300倍に希釈した次亜塩素酸ナトリウム溶液100 μlを加えてその発光を測定した。測定はLUMAC(LUMAC SYSTEMS A.G.)によりおこなった。結果を第¹図に示した。

4. 図面の簡単な説明

第1図は実施例1のサンドウィッチ法による

RGG測定結果を示す。

特許出願人 東レ株式会社

